

VOLUME 1^o
FASCICOLO V^o

(Riv. Istoch. norm. pat.)

DICEMBRE
1955

RIVISTA DI ISTOCHIMICA

NORMALE E PATOLOGICA

DIREZIONE

BARIGOZZI C.
BIGNARDI C.
BOZZA G.

BRUNI A. C. †
CIARANFI E.
REDAELLI P. †

VIALLI M.
VILLA L.
ZAMBOTTI V.

REDAZIONE

FILOTTO U.
PECCHIAI L.

PRETO PARVIS V.
SENALDI M.

ROMANINI MANFREDI M. G.

Francisco Alberto Saez

Estudio microespectrofotometrico de la heterocromatina
y eucromatina

I. P. L.

Industria Poligrafica Lombarda Viale Teodorico N. 5 - Milano

Estudio microespectrofotométrico de la heterocromatina y eucromatina

por FRANCISCO ALBERTO SÁEZ

INTRODUCCION

Se hace cada vez más evidente que la mayoría de los fenómenos fisiológicos se hallan restringidos al área diminuta de un componente intracelular. De aquí la importancia de conocer la localización citoquímica de las sustancias que puedan suministrar un indicio de la función específica que cumple una determinada estructura del sistema celular.

Un intricado problema de la biología celular es sin duda alguna el de las intercorrelaciones del sistema heterocromatina y ácidos nucleicos, íntimamente ligado al de la síntesis proteica. De ahí el considerable interés que presenta el conocimiento de la estructura y fisiología de la heterocromatina y eucromatina.

En el estado de nuestros conocimientos resulta difícil discurrir acerca de si existe alguna diferencia citoquímica entre ambos tipos de cromatina, ya que desde el punto de vista químico, este aspecto como lo ha hecho notar acertadamente Barigozzi (1951) es prácticamente desconocido.

(1) Al Director del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Prof. C. Estable y a la Fundación Rockefeller que proporcionaron su valiosa ayuda para la realización de investigaciones en el Departamento de Zoología de Columbia University, New York y en el Institute for Cell Research and Genetics, Karolinska Institutet de Estocolmo, Suecia, mi reconocimiento, como así también al director de dicho Instituto Prof. T. Caspersson y Dres. G. Moberger, H. Fernández Morán, G. Klein y Sra. W. Beermann, G. Bahr, Ing. L. Aquilonius, Ing. H. Kudimowsky, Miss M. Sunwall y Mrs. D. Nelson, por las atenciones recibidas durante mi permanencia en ésta.

Me complace en agradecer al Prof. A. W. Pollister y Dres. L. Ornstein, M. H. Himes y M. H. Flax, de la Universidad de Columbia, el interés y ayuda dispensados en el curso de este trabajo.

Al Prof. Dr. Claudio Barigozzi, Director del Instituto de Genética de la Universidad de Milán le agradezco la publicación de este trabajo en Italia.

Investigaciones recientes efectuadas en el laboratorio de citología del Departamento de Zoología de la Universidad de Columbia, New York (Flax y Himes, 1952, Saez 1925, Himes inédito y Flax inédito) sobre el comportamiento de los ácidos nucleicos con el colorante metacromático Azur B, han puesto de manifiesto que es posible obtener una deferenciación cito química del ácido desoxiribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) celulares por medio de esta substancia. Es sabido que el Azur B es un colorante metacromático y por tanto susceptible de producir doble tinción diferencial específica de determinados componentes de los tejidos y las células.

Los ácidos nucleicos presentan propiedades metacromáticas, actuando como cromotropo o sustancia metacromática el ARN mientras que el ADN es ortocromático, tiñendose por tanto del mismo color que la solución acuosa del colorante.

Estos trabajos han mostrado que el Azur B se combina no sólo con los ácidos nucleicos sino que también lo hace con los polisacáridos de función ácida.

Se ha experimentado la influencia de la temperatura, concentración, variación del pH, digestión enzimática (desoxiribonucleasa y ribonucleasa) con el objeto de probar la especificidad de la tinción y estudiar las curvas de absorción de substratos químicamente definidos (fibras de ARN y de ADN) teñidos con Azur B, comprobándose su similitud a las obtenidas citológicamente (Flax y Himes, 1952).

El análisis del espectro de absorción efectuado en soluciones y directamente en la preparación microscópica por medio del espectrofotómetro de Beckman y del microespectrofotómetro de Pollister y Moses respectivamente, ha demostrado que este colorante cuando se une a los ácidos nucleicos presenta las curvas de absorción características de las sustancias metacromáticas. Dicho de otra manera, que las soluciones de Azur B, no siguen la ley de Beer-Lambert (a cualquier longitud de onda, la extinción o densidad óptica es estrictamente proporcional a la concentración) puesto que a medida que aumenta la concentración, aparecen nuevas bandas en las curvas de absorción. En efecto, el análisis espectrofotométrico pone en evidencia la existencia de curvas con tres picos o bandas. La banda de absorción ortocromática situada en el rojo a 650 m μ y las bandas metacromáticas β , situada a 590 m μ en la región del verde y μ a 545 m μ en el azul verdoso del espectro.

En el presente trabajo que puede considerarse un intento preliminar de penetrar en este campo inexplorado y que será seguido de otros más

completos que se realizarán en nuestro departamento, hemos hecho uso de dos recursos analíticos complementarios: a) el exámen citoquímico de los cambios de las propiedades tintoriales de la cromatina que se cumplen durante las diferentes etapas del ciclo mitótico y meiótico y b) el método microespectrofotométrico para estudiar las variaciones específicas que presumiblemente deben tener lugar en los cromosomas eucromáticos durante el antedicho ciclo divisional de la célula.

MATERIAL Y METODOS

Como material se emplearon las gónadas masculinas de dos especies de ortópteros acridios *Melanoplus femurrubrum* y *Chortophaga viridifaciata* recogidos en los alrededores de la ciudad de Nueva York.

Los fijadores usados fueron el alcohol acético en la proporción de tres partes de alcohol absoluto y una parte de ácido acético glacial, y el formol al 30 %. En ningún caso el tiempo de fijación fué mayor de 30 minutos. Son estos los fijadores más convenientes para estudios citoquímicos. La inclusión se hizo en parafina previo pasaje por benzeno o cloroformo mezclado en distintas proporciones con la parafina. Se hicieron cortes de 3, 5 y 10 micrones. El colorante Azur B que es una tiazina básica, fué obtenido de la National Aniline Division, certificado NAb2 con un contenido de 88 % de colorante. Se hicieron soluciones acuosas al 0.2 mg, 0.25 mg. por cm^3 . Para mantener la solución a un pH de 4.0 se usó como buffer el Ftalato ácido de potasio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$), agregando 0.5 gr. del mismo a 50 c.c. de la solución de Azur B.

La coloración se llevó a cabo del siguiente modo:

- 1.) Colorear en la solución de Azur B durante dos horas a 40° C.
- 2.) Lavado en agua destilada 5 minutos.
- 3.) Diferenciación en alcohol butílico terciario durante doce horas. Se puede reducir el tiempo hasta veinte minutos de acuerdo al material.
- 4.) Dos pasajes por xilol hasta completo aclaramiento.
- 5.) Montaje en clarita, aceite de cedro o bálsamo neutro.

La preparación debe exhibir clara metacromasia presentando el ARN en tono rojo oscuro (metacromático) y el ADN en azul verdoso (ortocromático). Los polisacáridos de función ácida se tiñen metacromaticamente.

Con la finalidad de controlar la especificidad de la tinción de los componentes intracelulares se realizaron pruebas de digestión enzimática por medio de la ribonucleasa y desoxiribonucleasa, conjuntamente con una serie de preparaciones que fueron utilizadas como testigos dejándolas en agua destilada el mismo tiempo que las tratadas por las enzimas. El tratamiento experimental previo ensayado para inducir posibles cambios de las propiedades tintoriales de la cromatina consistió en someter los preparados a la acción del agua caliente a temperaturas que oscilaron entre 50° C y 85° C durante 5, 10, 15, 20 y 30 minutos, después de lo cual se efectuó la coloración. También en este caso se emplearon como controles una serie de preparados sin pretratamiento sumergidos en agua destilada a la temperatura ambiente, los que luego se tiñeron en la misma solución de Azur B.

Para el estudio citofotométrico o sea la capacidad que tienen los diferentes componentes intracelulares para absorber la luz a diferentes longitudes de onda, utilizamos el método de determinación fotométrico directo sobre la preparación microscópica cuyos fundamentos y alcance han sido descritos por Pollister y Ris (1947), Pollister y Moses (1949), Pollister (1950, 1952), Pollister, Himes y Ornstein (1951), Ornstein (1952), Swift (1950, 1953), Patau (1952) y Moses (1952).

Una vez colocada la preparación microscópica en la platina se hace pasar la luz a través de un monocromador lo que permite cambiar la longitud de onda y trazar así a través de todo el espectro visible, en nuestro caso de 480 a 690 m μ , la curva de absorción completa de una determinada región de la célula. El fotómetro empleado, es con algunas modificaciones similar al descrito por Pollister (1952) y consiste esencialmente de las partes indicadas en la figura 1.

La imagen de la célula o de una zona limitada de la misma es ampliada considerablemente al ser proyectada sobre un diafragma que se encuentra encima del fuelle y al nivel del fototubo. Centrando cuidadosamente una imagen dada y cerrando el diafragma hasta circunscribir un punto especial de la célula, como ser parte de un cromosoma o de un nucleolo etc., de una superficie que puede alcanzar a 0.5 μ o menos, la luz que atraviesa dicha estructura incide sobre el fototubo cuya sensibilidad es acusada por las deflexiones del galvanómetro, da una fracción decimal cuyo valor relativo es el que se tiene en cuenta para medición de la luz absorbida.

En cada análisis fotométrico se efectuaron dos lecturas, una a través de la célula o parte de la misma que llamamos (I) y la otra a través de una zona vacía del preparado sin ningún tejido interpuesto al haz luminoso

que llamamos lectura en blanco (I_0). La relación entre la intensidad de la luz transmitida (I) y la luz incidente constituye la transmisión T , $\frac{I}{I_0} = T$. El logaritmo de la inversa $\log 10^{-\frac{I_0}{I}}$ es la densidad óptica o extinción

$$E = \frac{I_0}{I} = E.$$

Como es sabido para una zona determinada de la célula la extinción es de acuerdo a la ley de Beer-Lambert proporcional a la concentración (c) y al espesor de la substancia absorbente (d); relación que se expresa en forma simple por la ecuación:

$$E = k c d$$

en la que k es una constante específica de extinción.

Luego es función de la concentración c . Si el espesor (d) no varía y el valor E se hace doble, significa que hay una concentración (c) doble. Si inversamente el espesor se hace doble, un valor de extinción doble significará que la concentración no ha cambiado.

En la práctica se emplean los valores de extinción E para conocer la absorción de los componentes celulares a distintas longitudes de onda. De este modo se está en condiciones de efectuar mediciones fotométricas de la absorción del Azur B unido a las diferentes regiones de los cromosomas y el nucleolo durante las sucesivas etapas de la mitosis y meiosis. Para ello es menester seleccionar estructuras bien homogéneas y suficientemente espaciadas para que no se superpongan y permitan el análisis con el mayor grado de reproducibilidad posible.

RESULTADOS

Con el objeto de estudiar la actividad cromotrópica de los ácidos nucleicos que se encuentran en la heterocromatina y eucromatina, seleccionamos dos estadios de la eucromatina para el análisis, a saber; la cromatina difusa que está bien representada por los núcleos interfásicos de las células nutridoras del testículo y la cromatina condensada que se halla en los cromosomas compactos durante la metafase y anafase temprana de las células goniales y somáticas. Para el estudio de la heterocromatina el mejor objeto lo constituye el cromosoma sexual que se encuentra en estado de máxima condensación durante la profase meiótica especialmente en los estadios leptoténico, paquiténico y diploténico temprano.

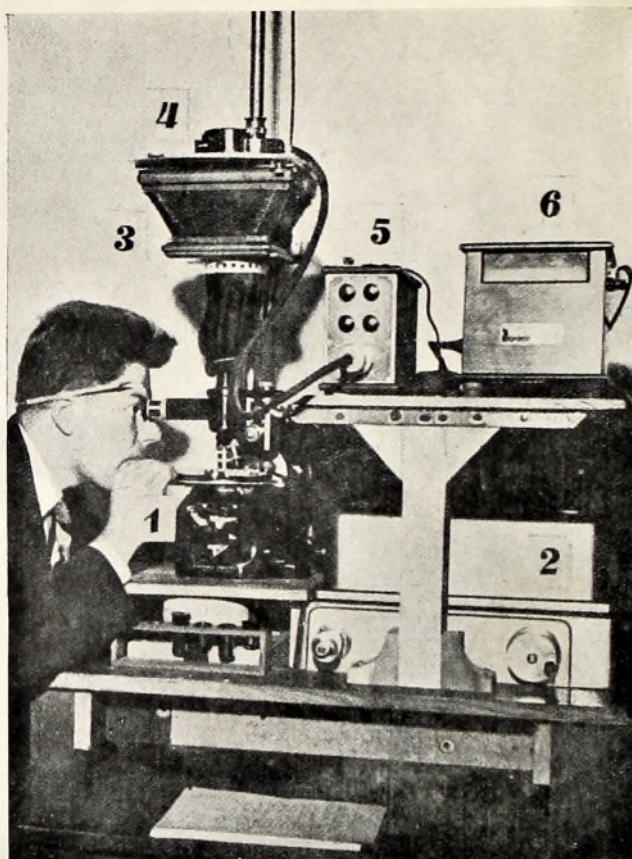


Figura 1. - Aparato empleado para la medida de las curvas de absorción en las células, según el modelo de Pollister (1952). - 1, Microscopio con tubo lateral. 2, Monocromador Perkin-Elmer, con prisma de cuarzo. 3, Cámara fotográfica. 4, Fotómetro de Farrand con foto multiplicador. 5, Batería con unidad de control. 6, Galvanómetro.

Flax y Himes (1952) pusieron de manifiesto que el espectro de absorción del Azur B en soluciones acuosas se comporta de modo similar al de otros colorantes metacromáticos en el sentido de que no siguen la ley de Beer-Lambert.

Con las soluciones de Azur B a 0.2 y 0.3 mg. por centímetro cúbico, a un pH 4.0 se pone de manifiesto que los componentes celulares presentan en las preparaciones una tinción diferencial característica. Las células goniales durante la profase, exhiben sus cromosomas teñidos en un tono azulado verdoso que los destaca nitidamente, en tanto que el citoplasma muestra una leve tinción rosada. A medida que avanza la profase y ya en plena metafase de esta generación celular, los cromosomas toman un color azulado algo más oscuro que en las profases tempranas.

Los núcleos de las células nutridoras destacan sus cromosomas difusos en forma de grumos irregulares fuertemente teñidos en azul claro con tendencia al verde. En estos núcleos y en cortes apropiados se encuentran uno o más nucleolos que pueden identificarse sin dificultad por su coloración rojizo-morada.

Durante la profase meiótica y especialmente en los estadios leptoténico final, paquiténico y principio del diploténico, la tinción diferencial llega a su expresión más nítida. El cromosoma sexual se muestra coloreado en verde azulado en su totalidad en tanto que el nucleolo, que en esta etapa profásica presenta un volumen similar al de dicho cromosoma, se halla teñido en rojo morado. Ambos elementos se destacan claramente en la cavidad nuclear en los cortes de 3 y 4 micrones. Los filamentos del cromonema adquieren en cambio una tonalidad verdosa sumamente pálida, que en ciertos casos hace difícil percibir su existencia. Es indudable, de acuerdo a las propiedades que tiene el Azur B cuando se une a los tejidos, que las tinciones diferenciales puestas de manifiesto por los preparados, corresponden al comportamiento metacromático de los ácidos nucleicos. La tinción azulado-verdosa y ortocromática es debida a la presencia de ADN en tanto que la tinción rojiza o metacromática pone en evidencia el ARN el cual actúa como cromotromo en este caso.

Las pruebas de control llevadas a cabo con la desoxiribonucleasa y la ribonucleasa confirman la electividad del Azur B por los ácidos nucleicos mencionados. La tinción después de actuar la ribonucleasa es de color azul verdoso en los cromosomas compactos y en la profase e interfase, no observándose la presencia de nucleolos. Inversamente, luego de actuar la desoxiribonucleasa, solo quedan visibles los componentes teñidos en rojo oscuro o sea el nucleolo y en un tono más pálido el citoplasma y el huso acromático. Cuando la acción de la desoxiribonucleasa se ha cum-

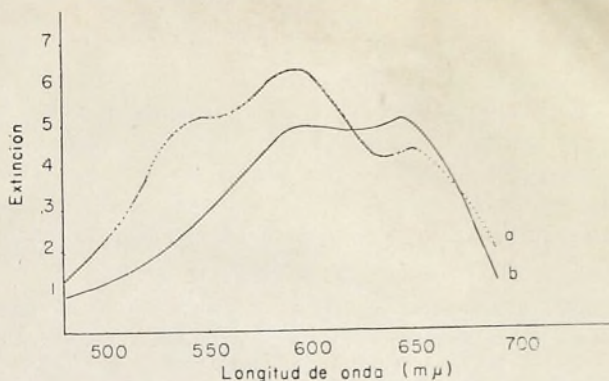


Figura. 2. - Curvas de absorción durante la profase meiótica del espermatocito I. Azur B, pH 4.0. - a, Curva metacromática del nucleolo (ARN). b, Curva ortocromática del cromosoma sexual heterocromático (ADN).

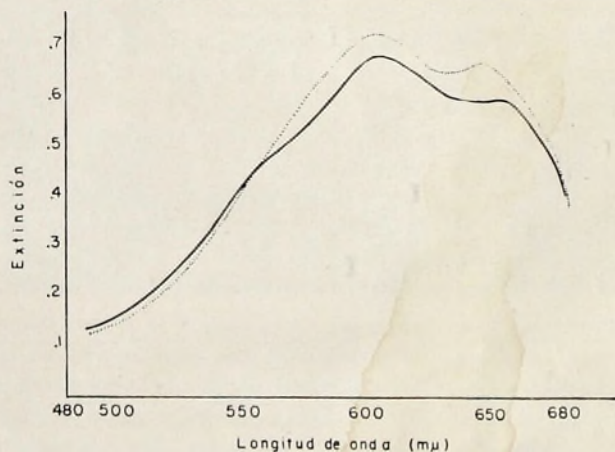


Figura 3. - Curvas de absorción de la eucromatina. Cromatina condensada (Cromosoma metafásico) indicado en línea punteada. Cromatina difusa (nucleo interfásico) de una célula nutridora, indicado en línea llena.

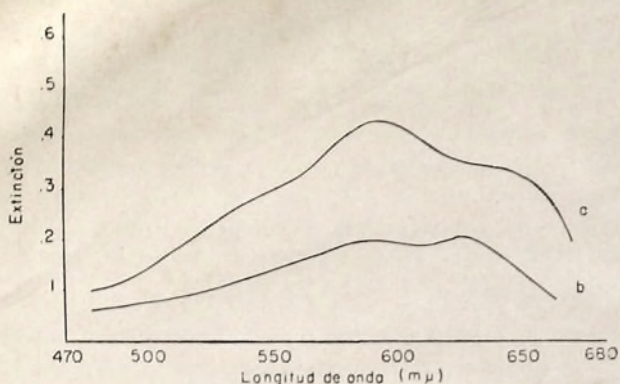


Figura 4. - Curvas de absorción de la heterocromatina. - a, Cromosoma sexual heterocromático durante la profase meiótica después del tratamiento con agua caliente (15 minutos a 50°C). Curva de tipo metacromático. b, Cromosoma sexual heterocromático en el mismo estadio anterior sin tratamiento. Curva ortocromática.

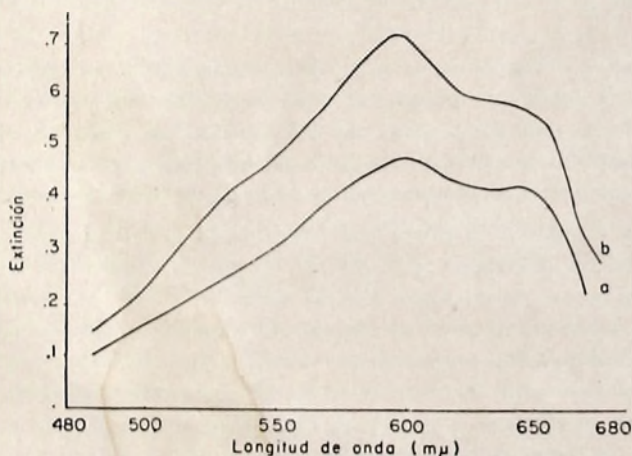


Figura 5. - Curvas de absorción de la eucromatina sometida al tratamiento con agua caliente (15 minutos a 50°C), en que se muestra que no hubo modificación producida por dicho tratamiento. La forma de la curva es similar a la de la figura 3. a, Cromatina condensada (cromosoma metafásico). b, Cromatina difusa (nucleo interfásico).

plido hasta el final, se destacan los espacios vacíos que ocupan los cromosomas inciertos en el huso metafásico, anafásico o de la telofase temprana, como grandes vacuolas incoloras. Mediante el empleo adecuado de estas extracciones enzimáticas es posible determinar la localización del ARN y del ADN con relativa seguridad en la estructura celular que se estudia.

El examen detenido de las preparaciones que fueron preparadas con agua caliente a diferentes temperaturas y tiempos, muestra las mismas características metacromáticas que las no sometidas a dicho tratamiento experimental. No es posible distinguir citológicamente entre la intensidad de coloración de los cromosomas sexuales de un mismo estadio, ya sea en los tejidos preparatados como en los no tratados.

En consecuencia se comprueba que el análisis citoquímico estrictamente microscópico no puede constituir un medio para establecer diferencias de intensidad en la tinción de una determinada estructura cuando se la somete a la acción del agua caliente.

Análisis espectrofotométrico.

La sensibilidad de las técnicas espectrofotométricas aplicadas al estudio de los cambios de intensidad específicos de la coloración, producidos por el Azur B nos han permitido poner de manifiesto algunos hechos de interés.

El análisis del espectro de absorción llevado a cabo en una serie continua de 21 lecturas de longitudes de onda desde 480 a 680 m μ , de la heterocromatina y eucromatina como así del nucleolo en distintos momentos del ciclo (mitótico y meiótico) revela la existencia de curvas características concordantes con el comportamiento metacromático del colorante.

La Fig. 2 muestra la curva ortocromática (b) obtenida para el cromosoma sexual en un estadio de la profase en que se encuentra fuertemente condensado y con su máxima concentración de ADN. Tal como ilustra la figura 2 dicha curva tiene su máximo de extinción a 650 m μ para luego disminuir suavemente, presentar un vientre más o menos a los 575 m μ , y caer paulatinamente hasta la banda de 450 m μ . La curva (a) de la fig. 2, corresponde al nucleolo y presenta una configuración diferente. Es evidente que la curva de absorción (a) muestra la forma típica correspondiente a las sustancias metacromáticas, en este caso el ARN.

Se pone de manifiesto el pico α que es el menos pronunciado a 650 m μ en la región del rojo del espectro, el pico β que es el más prominente en la banda de 590 m μ del verde y el tercer pico μ entre los 540 y 545

m μ , situado en el azul verdoso del espectro. Ambas curvas están bien diferenciadas por lo cual se hace más fácil la identificación de las mismas.

Se ha realizado un número considerable de mediciones fotométricas, las que salvo variación inherente a las inhomogeneidades del material arrojan resultados estadísticamente semejantes y por tanto reproducibles. Esto desde luego respecto al nucleolo y al cromosoma sexual que es heterocromático durante la profase meiótica especialmente en los estadios leptoténico, paquiténico y diploténico.

La eucromatina constituida por los cromosomas metafásicos, somáticos y meióticos, como así los que se encuentran en estado de cromatina « difusa » (interfase de las células nutridoras), presentan una curva de absorción un tanto distinta (Fig. 3), pues la banda máxima de absorción se encuentra cerca de los 600 m μ con una suave elevación en los 650 m μ . Un hecho importante que se pone en evidencia es de que el cromosoma sexual exhibe en general un tipo de absorción más ortocromático que los cromosomas eucromáticos, tal como puede verse al comparar las curvas de las Figs. 2 y 3. Hay por tanto una absorción de AND más típica para la heterocromatina que para la eucromatina.

Los experimentos llevados a cabo sometiendo los cortes antes de la tinción a la acción del agua caliente, a distintas temperaturas y tiempo, evidenciaron la producción de cambios en la curva de absorción. Uno de los más conspicuos de estos desplazamientos es el que tiene lugar cuando el tratamiento se lleva a cabo a 50° C durante 15 minutos. La curva de absorción del cromosoma sexual (en preparaciones teñidas con Azur B a 0.25 mg. por centímetro cúbico de agua, pH de 4.0 durante tres horas a 40° C), que habitualmente es de tipo ortocromático como lo hemos descrito anteriormente (Fig. 2), se desplaza hacia las zonas de longitud de onda más cortas. Presenta en este caso su máximo en una nueva banda situada entre 590 y 600 m μ (Fig. 4 a), con tendencia hacia el tipo de absorción que caracteriza a las sustancias metacromáticas.

No se percibe ninguna variación citológica de la tinción en las células pretratadas y sin tratamiento. Solo el análisis espectrofotométrico evidencia este cambio de la absorción del cromosoma sexual.

Contrariamente a lo observado antes, el comportamiento de los cromosomas eucromáticos, ya sea en la interfase como en la metafase o anafase, no presenta modificaciones en la forma de las curvas de absorción. El tratamiento con agua caliente no produce en este caso efecto en la sustancia eucromática. Este hecho singular parecería indicar la presencia de una estructura diferente en ambos tipos de cromatina.

Un análisis espectrofotométrico comparativo de los cromosomas compactos (meta-anafásicos) e interfásicos (células nutridoras) durante la mitosis y meiosis de las células tratadas y con tratamiento, demuestra la misma modalidad del espectro de absorción en ambos casos.

Cabe destacar que se utilizaron las mismas preparaciones y por tanto idéntico tratamiento y técnica tanto para la determinación espectrofotométrica como para la citológica. De manera pues, que no es posible poner de manifiesto citológicamente ninguna diferencia en la intensidad de coloración de las estructuras celulares.

DISCUSION

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que existe una selectividad bien manifiesta del ADN y ARN cuando se efectua la tinción con el colorante metacromático Azur B en soluciones de 0.2 a 0.3 mg. por centímetro súbico a un pH de 4.0.

Si se considera que de acuerdo a la teoría de Michaelis y Granick (1945) la forma metacromática de un colorante es un estado de agregación dímero o polímero de la forma ortocromática o monómera, o sea que se constituyen agregados dimeros y polímeros de las moléculas del colorante al actuar sobre los cromotropos, el comportamiento cromotrópico estudiado por nosotros suministra un apoyo a la teoría basada en la polimerización de la coloración metacromática.

En las células teñidas, el colorante básico es extraído de la solución y combinado con el coágulo sólido o precipitado de los substratos. Esto sugiere que los substratos que se coloran de rojo se unen al colorante en una relación estérica tal que se forma una asociación dímera y polímera mientras que aquellos substratos que se tiñen de azul verdoso tienen las moléculas del colorante más espaciadas, de modo que substancialmente todo el color se debe al monómero azul.

De acuerdo a esta interpretación, el color de la tinción es un reflejo de la estructura intramolecular del substrato.

El análisis espectrofotométrico ha permitido la diferenciación de la heterocromatina que constituye el cromosoma sexual, la cual presenta un tipo de absorción ortocromático, en tanto que las bandas correspondientes a los demás cromosomas se encuentran en regiones de menos longitud de

onda. Podría inferirse que la heterocromatina tiene mayor concentración de ADN, lo que motivaría la banda de absorción ortocromática típica. Esta mayor concentración de ADN que la que tiene la eucromatina es lo que a nuestro entender tendría «bloqueado» al ARN en un grado mayor que esta última. Podría admitirse por otra parte que la eucromatina tendría enmascarado su ADN en el material estudiado por lo que se explicaría esa mayor tendencia a las formas dímeras de tipo β que presenta la heterocromatina, la cual se comportaría en el cromosoma sexual como un monómero.

En cuanto al sugestivo hecho del desplazamiento de la curva de absorción del cromosoma sexual por la acción del agua caliente hacia la región de las sustancias metacromáticas, es un fenómeno que de acuerdo a la nomenclatura empleada por Lison (1953) podría ser semejante a un viraje de metacromasia «positiva», pero vemos que en realidad no se trata del mismo proceso puesto que la tinción microscópica mantiene inalterable su tono verde-azulado cuyo cambio solo logra descubrirse por el análisis espectrofotométrico.

Por otra parte si los cromosomas eucromáticos tienen menos concentración de ADN o mayor de ARN, o bien si la curva de absorción acusa una interferencia de las proteínas asociadas a los ácidos nucleicos, lo cual afecta no solo la ionización de los grupos de ácido fosfórico, sino también todo el campo electrostático del complejo de ácidos nucleicos y proteínas, como así otros factores que entorpecen la unión del colorante con el sustrato, son incógnitas que requieren nuevas investigaciones para dilucidar este oscuro problema.

En este orden de ideas y de acuerdo a los resultados obtenidos puede admitirse la posibilidad de que el sustrato formado por la heterocromatina difiera del que posee la eucromatina en su estructura molecular.

No hay duda que existen diferencias en la cromatina de algunos cromosomas del complejo lo cual ha sido ya puesto en evidencia desde hace tiempo, por las técnicas de coloración. Como ejemplo está el caso de la heterocromatina que presentan ciertos segmentos cromosómicos. Además de la característica que tiene la heterocromatina, que ha sido descrita como alopecia espontánea e inducida experimentalmente (Darlington, Rensende, etc.) y de la función específica que le asigna Caspersson y su escuela en la síntesis proteica, se encuentra la heterocromatina caracterizada por diferencias genéticas (Schultz, Mather, Barigozzi, etc.). El sentido actual de la heterocromatina es el de una cromatina que se comporta diferencialmente en las más variadas condiciones. Desde luego esto implica la existen-

cia de distintos tipos de heterocromatina, como así de diferencias dentro de un tipo específico. Lo que no está aun aclarado son las relaciones existentes entre los diferentes tipos de heterocromatina.

La sugerencia de Baker y Callan (1950), de que debiera eliminarse el término heterocromatina, pues parecería referirse a una entidad química distinta, nos parece exagerada. Pensamos nosotros, que este término debe mantenerse en su sentido morfológico original tal como fuera creado por Heitz (1928).

Si tiene o no sentido admitir diferencias entre heterocromatina y eucromatina desde un punto de vista químico es asunto que aun está por resolverse.

Por lo pronto el resultado de nuestras observaciones suministra una fuerte presunción en favor de la existencia de una organización intramolecular distinta entre ambas clases de cromatina.

S U M A R I O

Se ha realizado un estudio de la heterocromatina y eucromatina en las células sexuales y somáticas de dos especies de insectos ortópteros por el método microespectrofotométrico y por medio del colorante metacromático Azur B.

Se ha comprobado que el Azur B se une a los ácidos nucleicos comportándose como cromotrópo el ARN que en el nucleolo y citoplasma adquiere un tinte rojo morado. El ADN que es ortocromático se colorea en la cromatina interfásica y en los cromosomas condensados en azul-verdoso.

El análisis espectrofotométrico del nucleolo muestra la existencia de curvas con las bandas a 650 m μ , a 590 m μ y a 545 m μ , características de las sustancias metacromáticas. La curva del cromosoma sexual heterocromático es típicamente ortocromática con su banda de máxima absorción a 650 m μ , mientras que los cromosomas eucromáticos difieren con respecto a éste en su curva de absorción.

El tratamiento antes de la tinción con agua caliente durante 15 minutos a 50°C, ejerce una acción en la heterocromatina del cromosoma sexual compacto, que se traduce en un desplazamiento de la curva que normalmente es ortocromática, hacia una región de longitud de onda más corta. Esta nueva curva que presenta su banda máxima entre 590 m μ y 600 m μ , tiene las características similares a las de las sustancias metacromáticas.

Por el contrario la eucromatina difusa de los núcleos interfásicos y la condensada de los cromosomas metafásicos y anafásicos, meióticos y somáticos, no es afectada por dicho procedimiento.

La heterocromatina cuando se encuentra en su máxima condensación difiere de la eucromatina que se halla condensada en un estado similar, por su espectro de absorción.

Solo el estudio citofotométrico suministra una base para establecer la diferenciación entre ambas cromatinas antes y después del tratamiento por lo que se considera posible que el substrato constituido por la heterocromatina posea una estructura intramolecular distinta.

RIASSUNTO

Sono state studiate la eterocromatina e la eucromatina nelle cellule sessuali e somatiche di due specie di insetti optopteri col metodo microspettrofotometrico e per mezzo del colorante metacromatico azzurro B.

Si è dimostrato che l'azzurro B si unisce agli acidi nucleici, comportandosi come cromotropo, l'RNA, che nel nucleolo e nel citoplasma assume una tinta rossa scura. Il DNA che si colora nella cromatina interfaseica e nei cromosomi condensati in azzurro-verde, risulta ortocromatico.

L'analisi spettrofotometrica nel nucleolo mostra la esistenza di spettri di assorbimento con bande a 650, a 590 e a 445 m μ , caratteristiche della sostanza metacromatica.

La curva del cromosoma sessuale eterocromatico è tipicamente ortocromatica con la sua banda di massimo assorbimento a 650 m μ , mentre che i cromosomi eucromatici rispetto a questo differiscono per la loro curva di assorbimento.

Il trattamento prima della colorazione con acqua calda a 50° C per 15 minuti esercita una azione sulla eterocromatina del cromosoma sessuale compatto che si traduce in uno spostamento della curva che normalmente è ortocromatica verso una lunghezza d'onda più corta.

Questa nuova curva che presenta la sua banda massima fra i 590 e 600 m μ ha le caratteristiche simili a quelle della sostanza metacromatica. Al contrario l'eucromatina diffusa nei nuclei interfaseici e quella condensata nei cromosomi metafaseici e anafaseici, meiotici e somatici non è influenzata da questo procedimento.

La eterocromatina quando si incontra nella massima condensazione differisce dall'eucromatina che si ha condensata nel medesimo stadio per lo spettro di assorbimento.

Solo uno studio citofotometrico da una base per stabilire la differenza tra le due cromatine prima e dopo il trattamento in modo da considerare possibile che lo strato costituito dalla eterocromatina possieda una struttura intramolecolare distinta.

RÉSUMÉ

On a étudié la hétérochromatine et la euchromatine dans les cellules sexuelles et somatiques de deux espèces d'insectes optoptères avec la méthode microspectrophotométrique et au moyens du colorant métachromatique Azur B.

On a démontré que l'azur B s'unit avec acides nucléiques se comportant comme chromotrope. Le RNA, qui dans le nucléole et dans le cytoplasme se charge d'une teinte rouge foncé, se comporte comme chromotrope; le DNA, qui se colore dans la chromatine interfaseique et dans les chromosomes condensés en azur-vert, résultats orthochromatique. L'analyse spectrophotométrique dans le nucléole montre l'existence de spectres d'absorption avec bandes à 650 m μ , à 590 et à 445 m μ , caractéristiques de la substance métachromatique. La courbe du chromosome sexuel hétérochromatique est typiquement orthochromatique avec sa bande d'absorption à 650 m μ , tandis que les chromosomes euchromatiques se distinguent par leur courbe d'absorption. Le traitement, avant la coloration, avec eau chaude à 50° C pendant 15 minutes exerce une action sur l'hétérochromatine du chromosome sexuel compacte qui se traduit en un déplacement de la courbe qui normalement est orthochromatique vers une longueur d'onde plus courte. Cette nouvelle courbe qui présente la maximum de la bande entre 590 et 600 m μ a les caractéristiques similaires à celles de la substance métachromatique. Au contraire l'euchromatine diffuse dans les no-

yaux interphasiques, meiosiques et somatiques n'est pas influencée par ce procédé. La hétérochromatine, lorsque on la trouve dans la plus haute condensation, diffère de l'euchromatine que l'on a condensée au même état pour le spectre d'absorption.

Seulement une étude cytophotométrique nous donne une base pour établir la différence entre les deux chromatines avant et après le traitement, de façon à considérer possible que la couche constituée par l'hétérochromatine possède une structure intermoléculaire distincte.

SUMMARY

A study of hetero- and euchromatin in sex and somatic cells of two species of orthoptera has been carried out with the microspectrophotometric method after staining with the metachromatic dye Azur B. It is shown that Azur B stains metachromatically the RNA contained in the nucleolus and cytoplasm with a red mulberry tint while the DNA of the interphasic chromatin and the condensed chromosomes stain orthochromatically in bluish-green.

The spectrophotometric analysis of the nucleolus shows a curve, with maximums at 650 m μ , 590 m μ and 545 m μ , typical of RNA. The sex-chromosome is orthochromatic with a maximum absorption at 650 m μ . This absorption curve shows however differences with the curves given by the euchromatic chromosomes.

Treatment with hot water (at 50°C) for 15 minutes, previous to the staining, has an action on the heterochromatin of the sex-chromosome which is shown by the shifting of the maximum to a wave length of 590-600 m μ (instead of 650 m μ) as it was previously. This new curve has characteristics which are similar to the absorption of metachromatic substances. This procedure has no effect on the diffuse euchromatin of interphasic nuclei and on the condensed metaphasic and anaphasic chromosomes of sexual and somatic cells.

It seems that only when the heterochromatin is in a state of maximal condensation it shows spectrophotometric differences with the euchromatin.

This difference can be demonstrated only by using the cytophotometric method before and after proper treatment of both types of chromatins. It is suggested that these differences in absorption is an indication of a different intramolecular structural arrangement in eu- and heterochromatin.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Heterochromatin und das Euchromatin in den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen zweier Arten von Geradflügler-Insekten wurden mikrospektrophotometrisch und mittels des metachromatischen Farbstoffs Azur B untersucht.

Es wurde gefunden, dass das Azur B sich mit den Nucleinsäuren verbindet und sich wie das Chromotop RNA verhält, das im Nucleus und im Cytoplasma eine dunkelrote Färbung annimmt, und ausserdem wie das DNA, das sich im interphasischen Chromatin und in den kondensierten Chromosomen blaugrün färbt.

Die spektrophotometrische Analyse zeigt die für metachromatische Substanzen charakteristische Kurven mit dem Band bei 650, 590 und 545 m μ .

Die Kurve des heterochromatischen Geschlechtschromosoms ist typisch orthochromatisch mit dem Bande des Absorptionsmaximums bei 650 m μ , während

die euchromatischen Chromosomen sich davon hinsichtlich ihrer Absorptionskurve unterscheiden.

Die 15 Minuten dauernde Behandlung mit Wasser von 50° C vor der Anfärbung hat auf das Heterochromatin des kompakten Geschlechtschromosom eine Wirkung, die sich in einer Verschiebung der Kurve, die normalerweise orthochromatisch ist, gegen eine kürzere Wellenlänge zu erkennen gibt.

Diese neue Kurve mit dem Maximalband zwischen 590 und 600 m μ hat ähnliche charakteristische Merkmale wie die metachromatische Substanz. Andererseits wird das in den interphasischen Nucleen verteilte, wie auch das in den metaphasischen, anaphasischen, meiotischen und somatischen Chromosomen kondensierte Euchromatin von diesem Verfahren nicht beeinflusst.

Das Heterochromatin in seiner stärksten Kondensation unterscheidet sich vom Euchromatin im gleichen Kondensationsstadium durch das Absorptionsspektrum.

Nur auf Grund einer cytophotometrischen Untersuchung kann eine Basis gefunden werden, um die Unterschiede zwischen den beiden Chromatinen vor und nach der Behandlung festzustellen, sodass es für möglich angesehen werden kann, dass die vom Heterochromatin gebildete Schicht eine deutliche intramolekulare Struktur aufweist.

BIBLIOGRAFIA

- BAKER, J. R. & CALLAN, H. G. - 1950, *Heterochromatin*, Nature, **166**, 227.
- BARIGOZZI, C. - 1951, *A general survey on Heterochromatin*. Potugaliae Acta Biol. Ser. A. Vol. Hom. R. B. Goldschmidt, p. 593, 620.
- CASPERSSON, T. - 1950, *Cell growth and cell function*. New York, Norton & C.
- FLAX, M. & HIMES, M. - 1952, *Microspectrophotometric analysis of metachromatic staining of nucleic acids*. Physiol. Zool. **25**, 297-311.
- HEITZ, E. - 1928, *Das Heterochromatin der Mose*. I. Jahrb. wis. Bot. **69**, 762.
- LISON, L. - 1953, *Histochimie et cytochimie animal*, 2a Ed. Gauthier-Villars, Paris.
- MOSES, M. - 1952, *Quantitative optical techniques in the study of nuclear chemistry*. Exp. Cell. Res. Suppl. **2**, 75-94.
- MICHAELIS, L. y GRANICK, S. - 1946, *Metachromasy of basic dyestuffs*. Jour. Amer. Chem. Soc. **67**, 1212.
- ORNSTEIN, L. - 1952, *The distributional error in microspectrophotometry*. Lab. Investig. **1**, 250-62.
- PATAU, K. - 1952, *Absorption microphotometry of irregular shaped objects*. Chromosoma, **5**, 341-62.
- POLLISTER, A. W. - 1950, *Quelque methodes de cytologie chimique quantitative*. Rev. d'Hémat. **5**, 527.
- POLLISTER, A. W. - 1952, *Photomultiplier apparatus for microspectrophotometry of cell*. Lab. Investig. **1**, 106-114.

- POLLISTER, A. W. - 1952, *Microspectrophotometry of fixed cells by visible light*. Lab. Investig. **1**, 231-249.
- POLLISTER, A. W. & RIS H. - 1947, *Cytological nucleoprotein determination in preparations*. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. **12**, 147.
- POLLISTER, A. W. & MOSES, M. J. - 1949, *A simplified apparatus for photometric analysis and photomicrography*. J. Gen. Physiol. **32**, 567.
- POLLISTER, A. W., HIMES, M. & ORNSTEIN, L. - 1951, *Localization of substances in cells*. Federation Proc. **10**, 629.
- SAEZ, F. A. - 1952, *Differentiation of meiotic heterochromatin and euchromatin by microspectrophotometric techniques*. Anat. Rec. **113**, 65.
- SWIFT, H. - 1950, *The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei*. Physiol. Zool. **23**, 169-98.
- SWIFT, H. - 1953, *Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins*. Int. Rev. Cytology **2**, Acad. Press, New York.

